製品コード 6166

研究用

TaKaRa

Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)

説明書

v201303Da

Retrovirus Titer Set（for Real Time PCR）は、リアルタイム RT-PCR を利用して MLV（murine leukemia virus：マウス白血病ウイルス）ベースのレトロウイルスベクターの RNA ゲノム量を測定し、力価（RNA タイター）を決定するためのセット製品です。
本セットを One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit ＊（Perfect Real Time）（製品コード RR066A/RR086A）と一緒に使用することで、ウイルス上清から直接 RNA タイターを測定することができ、サンプリングから約 4 時間で結果が得られます。また、MLV のパッケージグシグナル部分を増幅ターゲットにしていますので、ほぼすべての MLV ベースのレトロウイルスベクターの RNA タイターを測定することが可能です。
レトロウイルスベクターの感染力価を測定する場合、指標細胞にレトロウイルスベクターを感染させ、蛍光や薬剤耐性などを利用して感染効率を測定し力価（生物学的タイター）を算出する方法が通常用いられます。この方法には少なくとも数日を要し、またマーカー遺伝子や薬剤耐性遺伝子が搭載されていないレトロウイルスベクターの場合は測定することができません。さらに、生物学的タイターを指標に MOI（multiplicity of infection）を決めて細胞に感染させる場合には、力価測定に数日以上かかるため一旦ウイルス上清を凍結して感染まで保存する必要があり、凍結融解によるウイルス力価の低下を招き、意図するものとは異なる MOI で感染してしまう場合があります。
本セットはレトロウイルスベクターの RNA ゲノム量を測定しますので、マーカー遺伝子や薬剤耐性遺伝子とは関係なくタイター測定することができます。また、約 4 時間で測定結果が得られますので、ウイルス上清を凍結することなく目的の MOI で感染させることが可能となります。
併用する One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）は、SYBR® Green I 検出による 1 ステップリアルタイム RT-PCR 専用のキットです。伸長性に優れ短時間の反応で効率よく cDNA 合成が可能な逆転写酵素 PrimeScript と、PCR 酵素として定評のある *TaKaRa Ex Taq* HS を用い、反応系を 1 ステップ RT-PCR 用に至適化しており、安定した 1 ステップリアルタイム RT-PCR を行えます。

＊：SYBR® は Molecular Probes Inc 社の登録商標です。

I. セットの内容（100 反応分；25 μl 反応系）＊

1.	Forward Titer Primer FRT-1（10 pmol/μl）	50 μl
2.	Reverse Titer primer RRT-1（10 pmol/μl）	50 μl
3.	RNA Control Template（5×10^8 copies/μl）	10 μl
4.	EASY Dilution（for Real Time PCR）	1 ml×2
5.	DNase I（RNase Free）（5 U/μl）	40 μl
6.	10 × DNase I Buffer	50 μl
7.	RNase Inhibitor（40 U/μl）	10 μl

＊：リアルタイム RT-PCR 100 反応および DNase I 処理 20 反応用です。

II. 輸送・保存

輸送：－ 20℃
保存：－ 20℃

※ RNA Control Template は凍結融解の繰り返しによる分解を防ぐため、少量ずつ分注後保存することをお勧めします。Deep freezer にて－ 70℃～－ 80℃で保存してください。

III. セット以外に必要な試薬

One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR066A）または
One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit II（Perfect Real Time）（製品コード RR086A）

IV. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。使用前に必ずお読みください。

（1）反応液は、まとめて Master Mix（RNase Free dH_2O、バッファー、酵素等の混液）を調製すると便利です。Master Mix を作ることにより、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、撹拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。

（2）One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）に含まれる *TaKaRa Ex Taq* HS、PrimeScript RT enzyme Mix II は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50% グリセロール溶液で粘度が高いので、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。
これらの酵素類は使用直前まで－ 20℃で保存し、使用後は直ちに－ 20℃に保存してください。

（3）One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）に含まれる 2×One Step SYBR® RT-PCR Buffer III は、融解時に不溶物が見られる場合がありますが、溶解すれば問題ありません。Vortex 等を使用して、完全に溶解してから使用してください。

（4）試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。

V. 操作

One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）の説明書、および各機種の取扱説明書に従って操作してください。

1. タイター測定用ウイルス上清の調製（一過性に作製したレトロウイルスベクターのタイターを測定する場合）

一過性にレトロウイルスを調製した場合は、ウイルス上清中に co-transfection に用いたプラスミドが大量に含まれますので、上清をそのままリアルタイム RT-PCR を行うとバックグラウンドが高くなる場合があります。それを防ぐために、まず DNase I 処理を行い、プラスミドを分解します。
なお、ウイルス産生細胞を構築してレトロウイルスを調製した場合、通常 DNase I 処理は不要ですが、ウイルスベクター調製の際に細胞が溶解してゲノム DNA が溶出し、バックグラウンドが高くなる場合もありますので、サンプルに応じて適宜 DNase I 処理を行ってください。

1）以下に示す反応液を調製する。＊

＜1 反応あたり＞

試薬	使用量
一過性産生ウイルス	12.5 μl
10 × DNase I Buffer	2.5 μl
DNase I（5 U/μl）	2.0 μl
RNase Inhibitor（40 U/μl）	0.5 μl
RNase Free dH_2O	7.5 μl
Total	25 μl

2）以下の条件で DNase I 処理を行う。
37℃　30 分
70℃　10 分

＊：本セットには 20 反応分の DNase I 処理用試薬が含まれています。もし試薬を使いきった場合は、以下の単品を購入して使用してください。
Recombinant DNase I (RNase-free)（製品コード 2270A）
10 × DNase I Buffer を添付しています。
Ricombinant RNase Inhibitor（製品コード 2313A）

2. 検量線用サンプルの調製

検量線の作成方法には以下の 2 通りの方法があります。

・RNA Control Template を用いて検量線を作成する方法
本セット付属の RNA Control Template を用いてリアルタイム RT-PCR を行い、作成した検量線からウイルスの RNA タイターを算出します。この場合、得られる値はレトロウイルスベクター上清中に含まれるレトロウイルス RNA となります。被検サンプルを測定する際に、既に生物学的タイターを測定済みのレトロウイルスベクター（被検サンプルと同じベクター骨格で、同じ方法で調製したものが望ましい）を一緒に測定し、検量線から得られる RNA タイターと比較することで被検サンプルの生物学的タイターの目安になります。

・生物学的タイターを測定済みのレトロウイルスベクターを用いて検量線を作成する方法

既に生物学的タイターを測定済みのレトロウイルスベクターを段階希釈してリアルタイム RT-PCR を行い、作成した検量線から被検サンプルウイルスのタイターを算出します。この場合、得られるタイターは生物学的タイターと近い値になります。ただし、検量線作成に用いるレトロウイルスベクターと被検サンプルウイルスは、同じベクター骨格で、同じ方法で取得する必要があります。

以下に検量線用サンプルの調製方法を記載します。

2-1. RNA Control Template を用いて検量線を作成する場合

以下の手順を参考に、RNA Control Template の段階希釈溶液を作製する。＊

1）EASY Dilution（for Real Time PCR）で RNA Control Template（5×10^8 copies/μl）を 5 倍希釈し、1×10^8 copies/μl となるように調製する（チューブ 1）。

2）新たなチューブに EASY Dilution（for Real Time PCR）を 18 μl ずつ分注する（チューブ 2 ～ 6）。

3）よく混合したチューブ 1（1×10^8 copies/μl）から 2 μl を取ってチューブ 2 に加え、混合する。

4）チューブ 2 から 2 μl をチューブ 3 に加え、混合する。

5）同様の操作を繰り返し、チューブ 6 まで段階希釈する。

チューブ	RNA 溶液（μl）	EASY Dilution （μl）	コピー数（copies/μl）
1	2	8	1×10^8
2	2	18	1×10^7
3	2	18	1×10^6
4	2	18	1×10^5
5	2	18	1×10^4
6	2	18	1×10^3

＊：段階希釈液の手順例を示します。検量線作成用サンプルのリアルタイム RT-PCR に供するサンプル数に応じて希釈に使用する RNA Control Template の使用量を変えたり、ウイルス上清のタイターに応じて希釈段階を変えてください。

2-2. 生物学的タイターを測定済みのレトロウイルスベクターを用いて検量線を作成する場合

生物学的タイター測定済みのレトロウイルスベクターを用いて段階希釈（10 倍ずつ、5 倍ずつ、など）を行い段階希釈溶液を作製する。＊（VI. 実験例 2 に例を示す。）

＊：反応条件を揃えるため、希釈にはレトロウイルスベクター調製に使用した培地の使用をお勧めします。

3. リアルタイム RT-PCR 用反応液の調製

以下に示す反応液を氷上で調製する。＊1

＜1 反応あたり＞＊2

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III ＊3	12.5 μl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS（5 U/μl）＊3	0.5 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II ＊3	0.5 μl	
Forward Titer Primer FRT-1（10 pmol/μl）	0.5 μl	0.2 μM
Reverse Titer primer RRT-1（10 pmol/μl）	0.5 μl	0.2 μM
ウイルス上清、もしくは検量線作成用サンプル＊4, 5	2 μl	
RNase Free dH_2O ＊3	8.5 μl	
Total	25 μl	

＊1：Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）を使用する際の条件を示します。他の機器を使用する場合は、各機種の取扱説明書に従って操作してください。

＊2：安定したデータを取得するために、ウイルス上清や検量線作成用サンプルのそれぞれに対し、1 サンプルあたり 2 反応以上を行うことをお勧めします。

＊3：One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（製品コード RR066A）のコンポーネントです。

＊4：一過性に作製したレトロウイルスベクターの場合は、DNase I 処理を行います。V. 1 をご確認ください。

＊5：ウイルス調製培地中の血清などに反応阻害物が含まれていることがありますので、その場合は数倍～数十倍に希釈したウイルス上清を使用してください。また予め、希釈率を変えてタイターを測定し、阻害が無く測定可能な範囲を設定しておくことをお勧めします。（VI. 実験例 1 に例を示します。）

4. 反応を開始する。（Thermal Cycler Dice Real Time System *II* を用いる場合の操作方法）＊

反応チューブまたはプレートを遠心機で軽く遠心後、Thermal Cycler Dice Real Time System *II* にセットし、反応を開始する。

Pattern 1：逆転写反応
　Hold
　42℃　5 分
　95℃　10 秒
Pattern 2：PCR 反応
　Cycle：40
　95℃　5 秒
　60℃　30 秒
Pattern 3：Dissociation

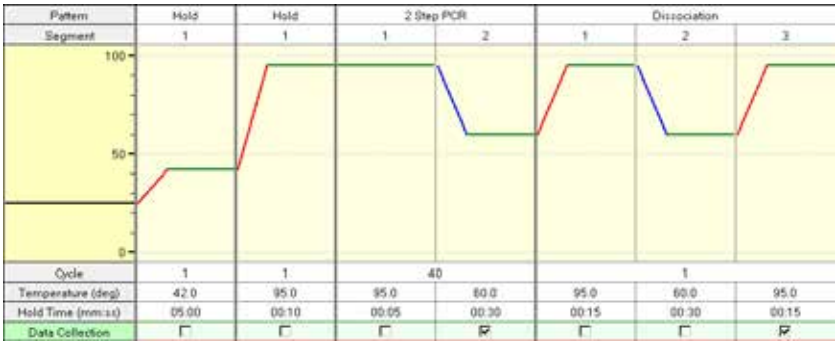

図 1.　Thermal Profile Setup 画面

＊：ここでは Thermal Cycler Dice Real Time System *II*（製品コード TP900）を使用する際の条件を示します。他の機器を使用する場合は、各機種の取扱説明書に従って操作してください。

5. 反応終了後、解析を行う。

反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、検量線の作成と被検サンプルの定量を行う。

VI. 実験例

実験例 1. レトロウイルス調製用培地の阻害確認

1. 方法

レトロウイルス産生細胞を構築し、無血清培地（GT-T-Retro I）で調製したレトロウイルスベクターならびに血清入り培地（DMEM、10% FBS 含有）で調製したレトロウイルスベクターを、それぞれ原液、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍に希釈し、リアルタイム RT-PCR を行った。希釈には、それぞれの調製に用いた培地を使用した。

2. 結果

希釈倍率と Ct 値の関係を図 2（無血清培地）、図 3（血清入り培地）に示す。
これらの培地では、大きな反応阻害は見られなかった。

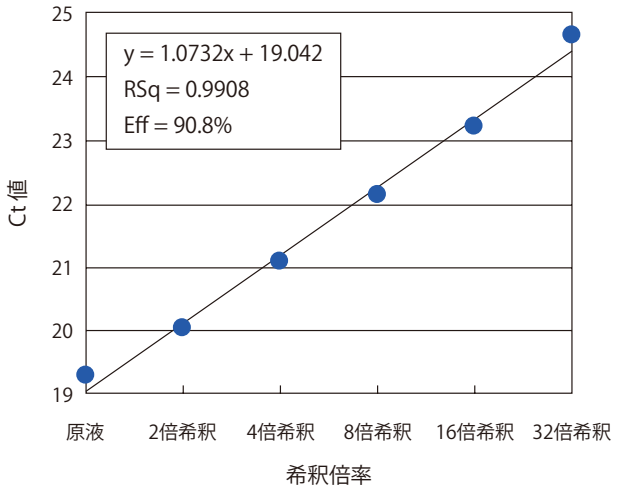

図 3. 血清入り培地（DMEM, 10% FBS 含有）で調製したレトロウイルスベクターの希釈倍率と Ct 値

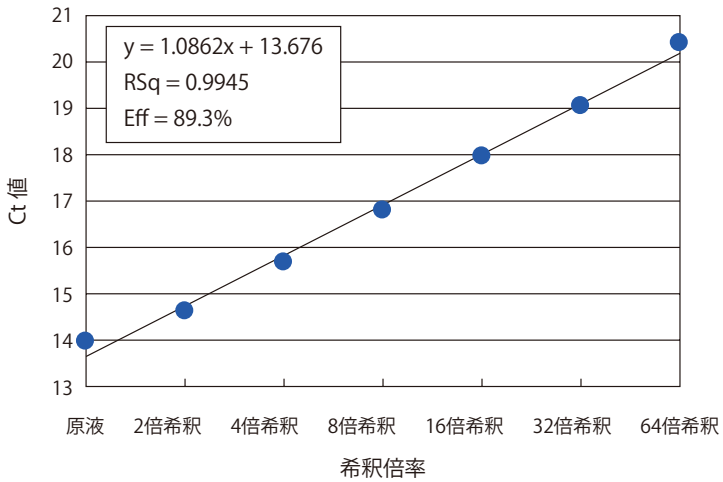

図 2. 無血清培地（GT-T-Retro I）で調製したレトロウイルスベクターの希釈倍率と Ct 値

実験例 2. 生物学的タイター測定済みのレトロウイルスベクターを用いた検量線の作成

1. 方法

   まず、血清入り培地（DMEM、10% FBS 含有）で一過性に調製した ZsGreen 遺伝子搭載レトロウイルスベクターを、HT1080 細胞に感染させて FACS 解析を行い、生物学的タイターを算出した（1.82×10^6 ivp/ml）。次に、このレトロウイルスベクターを同培地で原液、10 倍、100 倍、1,000 倍に希釈し、DNase I 処理を行った後、リアルタイム RT-PCR を行って検量線を作成した。

2. 結果

   図 4 に検量線を示すように、精度の高い検量線が得られた。

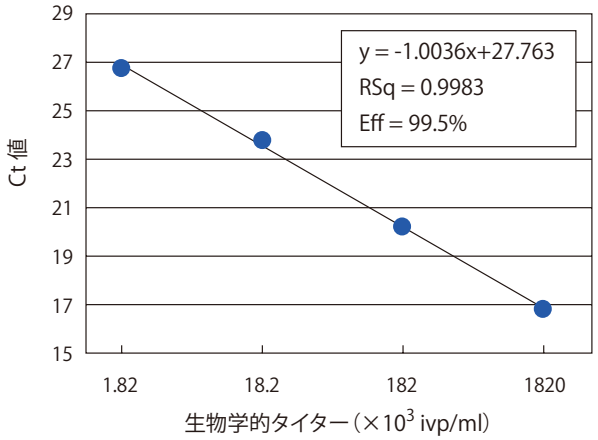

図 4. 生物学的タイター測定済みのレトロウイルスベクターを用いた検量線

VII. Appendix

RNA Control Template の取り扱いについて
きれいな検量線を引くためには RNA Control Template の分解を極力抑えることが重要で、使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。
RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

VIII. 関連製品

リアルタイム PCR 装置
Thermal Cycler Dice® Real Time System *II*（製品コード TP900）
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite*（製品コード TP700）

8 連チューブ & キャップ
0.2 ml Hi-8-Tube/0.2 ml Hi-8-Flat Cap（製品コード NJ300/NJ302）

レトロウィルスベクター用高効率遺伝子導入試薬
RetroNectin®（Recombinant Human Fibronectin Fragment）（製品コード T100A/B）

遺伝子導入用ガス透過性遠心バッグ
CultiLife® Spin（製品コード KB630）

一過性レトロウイルスベクター作製キット
Retrovirus Packaging Kit Eco/Ampho（製品コード 6160/6161）

レトロウイルスベクタープラスミド DNA
pDON-AI-2 Neo DNA/pDON-AI-2 DNA（製品コード 3653/3654）
pMEI-5 Neo DNA/pMEI-5 DNA（製品コード 3655/3656）

siRNA 発現用レトロウイルスベクタープラスミド DNA
pSINsi-hH1 DNA/pSINsi-hU6 DNA/pSINsi-mU6 DNA（製品コード 3660/3661/3662）

IX. 注意

- 本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- 本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先
TaKaRa テクニカルサポートライン
Tel 077-543-6116　Fax 077-543-1977
ホームページアドレス http://www.takara-bio.co.jp/

タカラバイオ株式会社

v201303Da